ESTUDIO *in vitro* DEL EFECTO DE DIFERENTES EXTRACTOS DE PLANTAS SOBRE LA PRODUCCIÓN DE GAS EN EL CONTENIDO DIGESTIVO DEL LECHÓN

Manzanilla E.G., Martín-Peláez S., Martín-Orúe S.M., Anguita M., Perez J.F., Gasa J.
Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària. Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra, Barcelona.

INTRODUCCIÓN

Tras la prohibición en 1999 del uso de antibióticos como promotores del crecimiento en la alimentación de lechones, las empresas del sector buscan alternativas que permitan mantener la producción sin empeorar el estado sanitario del ganado.

Una de las alternativas más estudiadas en los últimos años son los extractos de plantas (Mellor, 2000). En la bibliografía se dispone de información relativa a la utilización de muchos de estos extractos en alimentación humana. Sin embargo, los experimentos realizados en porcino son escasos. Por otra parte, el término extracto de plantas engloba gran cantidad de compuestos. Así pues se necesitan métodos de "screening" rápidos que indiquen la posible utilidad de estos compuestos y permitan seleccionar los más indicados para ser estudiados *in vivo*.

El objetivo del trabajo fue utilizar un método *in vitro* de producción de gas para estudiar la dosis a la que una mezcla de extractos de plantas (XT), y sus diferentes componentes por separado, mostraban efecto antimicrobiano.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizaron dos ensayos utilizando la misma metodología *in vitro*. Se obtuvo el contenido digestivo de 6 lechones (estómago, yeyuno y ciego por separado). Los lechones fueron destetados a los 21 días de edad y sacrificados una semana (experimento 1) o cinco semanas (experimento 2) tras el destete. En el experimento 1 la dieta era un pienso pre-starter comercial; 60% cereales, 25% productos lácteos, 10% soja extrusionada. En el experimento 2 se dio el pienso pre-starter comercial durante 4 semanas y se cambió a un pienso de crecimiento durante la quinta semana post destete; 60% cereales, 21% soja 44 y 10% soja extrusionada.

El contenido intestinal de los diferentes animales fue mezclado por tramos y se mantuvo refrigerado, en agitación y con un flujo continuo de CO_2 mientras se distribuía en tubos de cristal de 25 ml (15 ml de contenido por tubo). En cada tubo se había incluido previamente el tratamiento correspondiente. El oxigeno de los tubos se eliminó mediante la inyección de CO_2. Los tubos se cerraron herméticamente con tapones de goma de 1cm de grosor, se encapsularon para evitar perdidas de gas y se incubaron a 37ºC con agitación continua en un baño. La producción de gas fue registrada durante un periodo total de 6 horas utilizando una jeringa de cristal para liberar y medir la producción de gas en mililitros. Todos los tratamientos fueron probados por duplicado.

En el primer experimento se estudió el efecto de la mezcla de extractos de plantas XT en el contenido de estómago, yeyuno y ciego, a concentraciones de 0, 100, 1000 y 10.000 ppm. El XT es un mezcla estandarizada de 5% de carvacrol, 3% de cinnamaldehido y 2% de oleoresina de capsicum. En el segundo experimento se

estudió el efecto del carvacrol, el cinnamaldehido y la oleoresina de capsicum, por separado, en el contenido de estomago, yeyuno y ciego. Las dosis en este segundo experimento fueron diferentes según el producto y al medio a estudiar (tabla 2).

Todos los resultados se analizaron mediante el proc GLM de SAS 8.1 (1999).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el primer experimento, XT fue efectivo a dosis de 10.000 ppm y únicamente se detectó el efecto antimicrobiano en contenido de yeyuno (tabla 1).

TABLA 1. Evolución de la producción de gas (ml) *in vitro* en el contenido de estomago, yeyuno y ciego en el experimento 1 según la dosis de XT utilizada.

Estomago					DER	p-valor
Dosis (ppm)	0	100	1000	10000		
Tiempo (h)						
2	5.75	5.75	5.00	5.00	0.250	0.058
4	10.50	10.75	10.00	10.00	0.530	>0.5
6	14.25	14.25	13.50	13.50	0.661	>0.5
Yeyuno					RSD	p-valor
Dosis (ppm)	0	100	1000	10000		
Tiempo (h)						
2	16.00[a]	16.50[a]	16.75[a]	10.00[b]	0.810	0.003
4	27.50[a]	27.50[a]	27.75[a]	18.25[b]	1.089	0.002
6	29.50[a]	29.50[a]	29.75[a]	20.00[b]	0.952	0.001
Cecum					RSD	p-valor
Dosis (ppm)	0	100	1000	10000		
Tiempo (h)						
2	12.00	11.50	10.75	11.00	0.474	>0.5
4	18.00	17.75	17.25	17.00	0.866	>0.5
6	20.00	19.75	19.25	19.00	0.966	>0.5

Superíndices diferentes en una misma línea indican diferencias entre las medias.

En el experimento 2 el resultado fue diferente según el medio y el compuesto estudiado. No hubo producción de gas en el contenido del estómago. En el yeyuno, el carvacrol y el cinnamaldehido disminuyeron la producción de gas a partir de 1000 y 500 ppm respectivamente, y consiguieron la inhibición total de la producción de gas a partir de 3000 y 2000 ppm respectivamente. La oleoresina de capsicum produjo solo un ligero descenso en la producción de gas en contenido de yeyuno a partir de las 15000 ppm. En el ciego, el efecto inhibidor del carvacrol y del cinnamaldehido no se observó hasta las 3000 y 2000 ppm respectivamente. En el caso de la oleoresina de capsicum no se observó ningún efecto.

Existen muchos estudios que utilizan cultivos bacterianos puros para describir las concentraciones antimicrobianas de extractos de plantas. En general, estos estudios indican que las dosis efectivas de los extractos más potentes están entre 200 y 500 ppm e inhiben de manera inespecífica todas las especies bacterianas estudiadas. Sin embargo, los efectos de estos extractos se ven afectados por la composición del medio (Juven et al., 1994) y es necesario estudiar su posible efecto en el medio donde se pretenden aplicar. Los presentes resultados muestran como las concentraciones antimicrobianas de los extractos estudiados en el medio intestinal son mayores que las determinadas en cultivos puros, y además existen

diferencias en las concentraciones efectivas según el tramo del tracto gastrointestinal estudiado.

TABLA 2. Producción total de gas (ml) *in vitro* en el contenido de yeyuno y ciego en el experimento 2 según la dosis de carvacrol, cinnamaldehido (Cinnamald.) o oleoresina de capsicum (Ol. Caps.). (Tiempo = 6h).

Yeyuno						RSD	p-value
Dosis (ppm)	0	500	1000	2000	3000		
Carvacrol	92.17^{a}	88.00^{a}	53.25^{b}	8.25^{c}	0.75^{c}	5.839	<0.0001
Dosis (ppm)	0	500	1000	2000	3000		
Cinnamald.	92.17^{a}	56.00^{b}	4.75^{c}	0.00^{c}	0.00^{c}	5.233	<0.0001
Dosis (ppm)	0	500	1000	10000	15000		
Ol. Caps.	92.17^{a}	88.25^{a}	91.50^{a}	86.80^{a}	74.05^{b}	3.743	0.013
Ciego							
Dosis (ppm)	0	1000	2000	3000	4000		
Carvacrol	28.75^{a}	29.25^{a}	26.25^{a}	21.50^{b}	0.50^{c}	0.935	<0.0001
Dosis (ppm)	0	1000	2000	3000	5000		
Cinnamald.	28.75^{a}	26.5^{ab}	24.00^{b}	22.50^{b}	2.75^{c}	1.396	<0.0001
Dosis (ppm)	0	5000	8000	11000	14000		
Ol. Caps.	28.75	27.75	26.50	27.75	22.75	1.612	0.072

Superindices diferentes en una misma linea indicant diferencias entre las medias.

La dosis comercial recomendada para el XT es de 300 ppm. Esta dosis supone concentraciones de los principios activos mucho más bajas que las aquí descritas como inhibidoras de la fermentación bacteriana. Así, a pesar de que se han descrito efectos *in vivo* del XT sobre la microbiota intestinal (Manzanilla et al., 2004), estos efectos no parecen deberse a un efecto directo sobre la microbiota. Por otro lado, aunque el modo de acción de los extractos de plantas sea muy inespecífico, posibles efectos selectivos sobre algún grupo bacteriano no deberían descartarse.
También se observaron diferencias interesantes en la producción de gas según el tramo del tracto gastrointestinal. Sorprende la alta cantidad de gas producido en yeyuno en ambos experimentos. Estas variaciones deberían estudiarse en el futuro en diferentes partes del intestino delgado y según la edad del animal.
El método *in vitro* utilizado en estos ensayos puede ser de utilidad en el "screening" de la capacidad antimicrobiana de un alto número de compuestos, de forma rápida y barata. Además los resultados van a complementarse con análisis específicos de cultivos bacterianos y AGV's.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Juven, B.J., Kanner, J., Schved, F., Weisslowicz, H. 1994. . Journal of applied bacteriology, 76, 626-631.
Manzanilla, E. G., J. F. Perez, M. Martin, C. Kamel, F. Baucells, and J. Gasa. 2004. J. Anim Sci. 82:3210-18.
Mellor, S.2000. Feed mix, special 2000. 6-8.
SAS (1999) User's guide. Version 8.01 SAS Institute, Cary, NC, USA.